

Ph.D. disszertáció

**A PRIMER KINON ENERGETIKAI VÁLTOZÁSAI A
FOTOSZINTETIZÁLÓ BAKTÉRIUMOK REAKCIÓCENTRUMÁBAN:
MUTÁCIÓ, KÉSLELTETETT FLUORESzcENCIA ÉS
MODELL-SZÁMÍTÁSOK**

Rinyu László

Témavezető: Dr. Maróti Péter, egyetemi tanár
Szegedi Tudományegyetem, Biofizikai Tanszék
Szeged, 2007

1. Tudományos előzmények, bevezetés

A fotoszintézis az alapvető anyagcsere-folyamatok egyike. A fotoszintetizáló organizmusok (baktériumok, algák, magasabb rendű zöld növények) fényenergiát alakítanak át a szabadenergia egyéb (redoxpotenciál, ion- és proton elektrokémiai potenciál, valamint foszfátpotenciál) formáivá, amelyek közvetlenül alkalmasak a sejt életfolyamataihoz szükséges energia fedezésére, valamint raktározására. Ezek a szervezetek nem csupán magukat látják el energiával, hanem az őket fogyasztó organizmusokat is. Ezzel további élőlények számára is táplálékforrássul szolgálnak, egészen a tápláléklánc végét jelentő csúcsragadozókig. A fotoszintetikus folyamatok alapvetően két fő csoportra oszthatók: fényreakciókra és sötétreakciókra. A fényreakciókban a sötétreakciók energiaforrásai képződnek (ATP és redukált koenzimek), amelyek lehetővé teszik, hogy a különböző biokémiai anyagcsere-folyamatok (sötétreakciók) láncolatán keresztül nagy energiaértékű szénhidrátok keletkezzenek. A fényreakciók a foton abszorpcióját követően fehérjébe ágyazott, speciálisan orientált pigmentek közreműködésével mennek végbe. A zöld növényekben, ahol a fotoszintézis az eddig ismert legnagyobb hatékonysággal valósul meg, a fényreakciók során NADPH és ATP termelődik. Ezen folyamatban két egymástól jól elkülöníthető fotokémiai rendszer (PSI és PSII) vesz részt. A PSII-höz kapcsolódó komplex egyedülálló módon képes a víznek protonokká és molekuláris oxigénné való fényindukált elbontására, miközben redukáló ekvivalensek láncolatán keresztül az energia egy része proton elektrokémiai potenciál formájában raktározódik. Ez a potenciál az ATP szintézisének energiaforrásul szolgál. Az energia másik hányada átkerül a PSI-re, ahol újabb foton abszorpciója révén válik a folyamat teljessé a NADP redukcióját eredményezve.

A fotoszintetikus energiaátalakítás folyamatai baktériumokban lényegesen egyszerűbbek, mint a magasabbrendű zöld növényekben. Baktériumokban, a zöld növényektől eltérően, csak egyetlen fotokémiai rendszer (benne a fénygyűjtő antenna és a reakciócentrum fehérje-pigment komplex) működik. A zöld növények lineáris, részben ciklikus elektrontranszportláncával szemben a baktériumoké egyetlen ciklusból áll, melynek során a reakciócentrumban keletkezett töltéspár stabilizálódik. A bűrbaktériumok reakciócentruma a zöld növények PSII fotokémiai rendszerével mutat nagy mértékű hasonlóságot. A fényabszorpciót követően a reakciócentrum bakterioklorofill dimérje (P) gerjesztett szingulett állapotba kerül (P*). Az alapállapot és a gerjesztett állapot közötti energiakülönbség megegyezik az elnyelt foton energiájával. Ez *Rhodobacter sphaeroides* esetén 1380 meV [1]. Az elektronnak a primér donorról a bakteriofeofitinre (Bfeo) juttatását a bakterioklorofill monomer segíti a primér donor és a bakteriofeofitin, mint akceptor elektronfelhőinek átlapolá-

sával. Ezután az elektron alagúteffektussal jut át az elsődleges kinonra, a peptidváz magrezgése, illetve az áthidaló molekulák (az M252-es triptofán és az M218-as metionin [2, 3]) segítségével. A fotont abszorbeáló reakciócentrumok több, mint 98%-a eljut ebbe az állapotba, vagyis a fotoszintézis kvantumhatásfoka majdnem egységnyi. Ezzel szemben a fényfelhasználás energia-hatásfoka jóval kisebb, mindössze 30-40 %-os, mivel az energia 60-70 %-a elvész az elektronnak a nem fehérje természetű kofaktorok közötti vándorlás során. A legnagyobb energiavesztéssel járó folyamat az elsődleges kinon (Q_A) redukálódása, ezzel együtt ez a lépés szükséges *in vivo* körülmények között a töltésszétválásztás irreverzibilissé tételéhez.

A *Rhodobacter sphaeroides* bíborbaktérium reakciócentruma az elsődleges kinon mellett egy másik kinonmolekulát is tartalmaz (másodlagos kinon, Q_B). A két kinon kémiai szempontból azonos (UQ_{10}), mégis a redox- és a kötési tulajdonságaik eltérést mutatnak [4]. Ennek oka a fehérjekörnyezetük különbözősége [5]. Az elsődleges kinon erősen hidrofób környezetben helyezkedik el, és a reakciócentrum egyik fehérjealegysége (H-alegység) elszigeteli a vizes fázistól. Emiatt a kinon nem tud protont felvenni a redukciót (elektronfelvételt) követően. Fiziológiai körülmények között a Q_A egyszerűen redukálható, csak extrém magas fényintenzitás és erősen redukáló körülmények között figyelhető meg kétszeresen redukált formája [6]. A környező aminosavakkal és szerkezeti vizekkel több hidrogénhíd kötést tud kialakítani, és ezáltal igen erősen kötődik a reakciócentrumhoz, onnan csak drasztikus eljárással távolítható el [7]. Szemikinin alakja meglehetősen stabil: a redukcióval együttjáró szabadenergia-változás lényegesen pozitívabb a Q_A kötőhelyen, mint apoláros oldószerben [8, 9]. A Q_A/Q_A^- redox pár középponti redoxpotenciálját nemcsak a fehérjekörnyezettel kialakított szterikus és elektrosztatikus kölcsönhatás befolyásolja, hanem a reakciócentrum-fehérje és a lipid-membrán közötti kölcsönhatás is.

A másodlagos kinon fehérjekörnyezete ezzel szemben számos poláros aminosavat tartalmaz, ezek elektrosztatikus tere csökkentik le a Q_B^- energiáját. A kinon formailag kötődik a reakciócentrumhoz, könnyen leválasztható, vagy inhibitorral (pl. ofenantrolin, terbutrin, stigmatellin) helyettesíthető [10]. Szemikinin formája szintén nagyon stabil, 10^{12} -szer hosszabb élettartamú a reakciócentrumban, mint oldatban [8]. *In vivo* körülmények között a Q_B/Q_B^- pár középponti redoxpotenciálja 60 mV-tal pozitívabb, mint a Q_A/Q_A^- páré (pH=8.0) [11]. A másodlagos kinon teljes redukciója a reakciócentrumban is végbemegy, amely két elektrons, és ehhez csatoltan két proton felvétele járul. Az így képződött dihidro-kinol könnyedén leválik, helyébe a membrán szabad kinonjainak egyike lép [8, 12].

A gerjesztett dimér, a fotokémiai reakció mellett, foton kibocsátásával is visszajuthat az alapállapotba. A bakteriális reakciócentrum fényemissziója kétféle lehet: prompt és késleltetett fluoreszcencia. Mivel mindkettő a P^* gerjesztett állapot, és a

P alapállapot közötti átmenetből ered, így spektrálisan nem lehet megkülönböztetni egymástól. Intenzitásuk és időbeni lecsengésük ellenben alapvetően különbözik: míg a prompt fluoreszcencia a gerjesztés után néhány nanoszekundumon belül lecseng, addig a késleltetett fluoreszcencia mindaddig megfigyelhető, míg a visszreakciók (a $P^+B_{\text{feo}}^- \rightarrow P^*B_{\text{feo}}$, a $P^+Q_A^- \rightarrow P^*Q_A$ és a $P^+Q_B^- \rightarrow P^*Q_B$) táplálják [13], és intenzitása nagyságrendekkel kisebb a prompt fluoreszcenciánál. A késleltetett fluoreszcencia lecsengésének sebességállandója megegyezik a töltésszétválasztott állapotok töltésrekombinációs folyamattal való eltűnésének sebességállandójával, ami azt bizonyítja, hogy a késleltetett fluoreszcencia szivárgásból származik [14]. A milliszekundumos tartományba eső késleltetett fluoreszcencia és a prompt fluoreszcencia intenzitásvizsgálata alapján meg tudjuk határozni a $P^+Q_A^-$ töltésszétválasztott állapot abszolút szabadenergia-szintjét a gerjesztett dimér szabadenergia-szintjéhez képest [15]. Ezt más módszerrel csak közvetve és sokkal kisebb pontossággal lehet megtenni. Mivel a disszertációban a Q_A/Q_A^- redox pár középponti redoxpotenciálját befolyásoló tényezők feltérképezését és megvizsgálását tűztem ki célul, így a bakteriális reakciócentrum által kibocsátott késleltetett és prompt fluoreszcencia mérése az általam alkalmazott kísérleti spektroszkópai módszerek közül központi szerepet kapott.

2. Célkitűzések

A legfontosabb célom az volt, hogy az elsődleges kinonhoz közeli aminosavak mutációjával olyan reakciócentrumokat hozzunk létre, amelyekben a Q_A termodinamikai tulajdonságait befolyásoló, a fehérjekörnyezettel kialakított sztérikus és elektrosztatikus kölcsönhatásokat meghatározhasam, és jellemezhessem. Ehhez a primér donor által kibocsátott prompt és késleltetett fluoreszcencia intenzitásainak összehasonlításával meg fogom határozni a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbséget vad típusú és mutáns reakciócentrumokban. Ennek segítségével meghatározom a Q_A/Q_A^- redox pár *in situ* középponti redoxpotenciálját adott reakciócentrum-fehérjében.

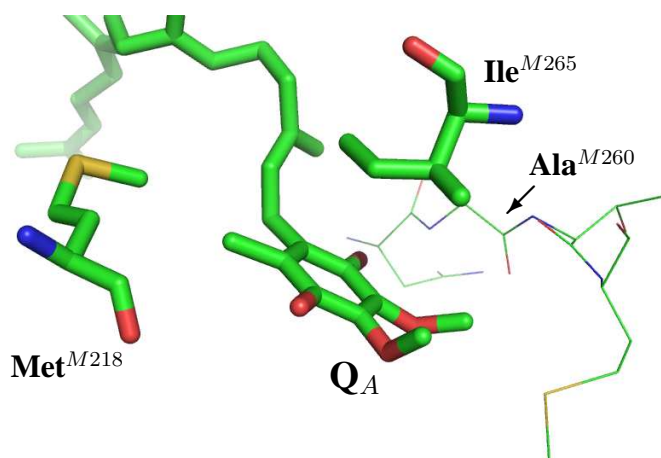
A röntgenkrisztallográfiai adatok alapján meghatározott atomi feloldású reakciócentrum szerkezet lehetőséget nyújt a mutációk okozta változások termodinamikai jellemzőinek számítógép-szimulációval való nyomon követésére. Dokkolási szimulációval meg fogom adni a kinon- és egyszeres negatív töltéssel rendelkező szemikininonmolekula kötési szabadenergiáját vad típusú és mutáns reakciócentrumokban, és ennek segítségével becslést fogok adni a Q_A/Q_A^- redox pár középponti redoxpotenciáljára. Emellett a szabadenergia perturbáció módszerének segítségével modellezni

fogom az elsődleges kinonmolekula redukálódásának folyamatát vad típusú és mutáns reakciócentrumokban.

A kardiolipin (difoszfátid-glicerol), mint modell-lipid felhasználásával a reakciócentrum-fehérje és a lipidkörnyezet közötti kölcsönhatást fogom vizsgálni. Tanulmányozni fogom, hogy milyen hatást fejt ki a töltésrekombinációs folyamatokra, valamint hogyan befolyásolja a kialakult töltéspár ($P^+Q_A^-$) szabadenergia-szintjét a gerjesztett primér donor energiaszintjéhez képest.

Membrán fragmentumba (kromatofora) ágyazott reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciájának vizsgálatával további információkat fogok gyűjteni a reakciócentrum-fehérjének és a lipid-membránnak a Q_A -ra gyakorolt hatásáról. Emellett jellemezni fogom az izolált kromatofora által kibocsátott késleltetett fluoreszcencia lecsengés összetett kinetikáját, valamint az új kinetikai komponens tulajdonságait.

3. Anyagok és módszerek



Az elsődleges kinon (Q_A) fehérjekörnyezete az 1AIJ jelű struktúra [16] alapján. A Met^{M218} és az Ile^{M265} reziduumokat kiemelve ábrázoltam, az M259-M262-es reziduum-csoportot, pedig vonalábrázolással mutatom be.

Baktériumtörzsek:

- *Rhodobacter sphaeroides* **R-26** karotinoidmentes (kék-zöld) törzs, mint vad-típus
- *Rhodobacter sphaeroides* **GA** karotinoidot tartalmazó (zöld) törzs, mint vad-típus, és az ebből az elsődleges kinon körüli reziduumok pontmutációjával készített mutáns törzsek:
 - **M265IV** Ile^{M265} → Val apoláros mutáns.
 - **M265IS** Ile^{M265} → Ser poláros mutáns.
 - **M265IT** Ile^{M265} → Thr poláros mutáns.
 - **M218MA** Met^{M218} → Ala mutáns.
 - **M218MG** Met^{M218} → Gln mutáns.
- CYCA1 *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, mint vad-típusból készített citokróm c₂-mentes mutáns.

A *Rhodobacter sphaeroides* reakciócentrumának izolálásánál és tisztításánál standard fehérje-tisztítási módszereket alkalmaztam: a sejteket ultrahanggal törtem fel, a membrán-fragmentumokat (kromatoforát) ultracentrifugálással nyertem, végül a reakciócentrumot LDAO detergenssel oldottam ki, és ammónium-szulfátos kicsapással, valamint DEAE-Sephacell ioncserélő oszlopkromatográfiával tisztítottam.

Az elsődleges kinon akceptor középponti redoxpotenciáljának vizsgálataihoz a *Rhodobacter sphaeroides* Ga vad-típusból készített Q_A közeli mutánsokat használtam, melyeknek reakciócentrumait tisztított állapotban Prof. Colin A. Wraight (University of Illinois, Biophysics and Plant Biology Center for Biophysics and Computational Biology, Urbana-Champaign, Amerikai Egyesült Államok) csoportjától kaptuk lefagyasztott állapotban.

Fényindukált abszorpcióváltozás mérése:

A minták aktív reakciócentrum-koncentrációját és a töltésrekombináció kinetikáját abszorpcióváltozás alapján határoztam meg egy házikészítésű egysugaras spektrofotométerrel 430 nm-nél (detergensben feloldott reakciócentrum), illetve 605 nm-nél (természetes membránba ágyazott reakciócentrum) [17].

A késleltetett és a prompt fluoreszcencia mérése:

A reakciócentrum bakterioklorofill dimérje által kibocsátott milliszekundumos késleltetett fluoreszcencia kinetikájának felvételére egy speciálisan erre a célra épített mérőberendezést használtam [18]. A mérési nehézségeket a késleltetett fluoresz-

cencia rendkívül alacsony intenzitása (izolált reakciócentrum esetében a kvantumhatásfoka kb. 10^{-9}), kedvezőtlen spektrális elhelyezkedése (az infravörös tartományban, 920 nm körül mérhető), és a gerjesztés alatt a minta által kibocsátott erős prompt fluoreszcencia okozza. A reakciócentrum-fehérjét tartalmazó minta pillanatszerű és telítési gerjesztését Q-kapcsolt Nd:YAG lézer frekvencia-kétszerezett fényimpulzusával (Qauntel YG 781-10) érték el: a gerjesztő lézerimpulzus hullámhossza 532 nm, időtartama 5 ns és energiája 100 mJ. A lézer fényét néhány méter hosszú út után vezettük be a zöld sáváteresztő üvegszűrővel (Schott BG-18) lezárt és nagyon gondosan sötétített dobozba, hogy a térszög csökkentésével minimalizáljuk a lézer villanólámpáinak szórt fénye által gerjesztett prompt fluoreszcenciát. A gerjesztő lézerfény a mintán való áthaladás után egy fénycsapdába kerül, és elnyelődik. Mindezzel minimumra csökkentettük a külső háttérfénynek a dobozba kerülését, az intenzív lézerfénynek a falakon való reflexióját, és az általa gerjesztett foszforeszcenciát. A reakciócentrum-fehérje tartalmú mintát egy $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ méretű, alacsony fluoreszcenciájú kvarcküvetába (Thermal Syndicate Ltd., "far UV") helyeztem, hőmérsékletét termosztálható küvetatartóval állítottam be, és K-típusú (NiCr-Ni) termoelemmel (Vermer VE 305K) ellenőriztem.

A detergensbe ágyazott reakciócentrum esetében 256, míg kromatofora membránba ágyazott reakciócentrum esetében 128 kinetikát átlagoltam digitális oszcilloszkóp segítségével. Az így kapott jeleket számítógépen tároltam, és értékeltem ki.

A P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbség kísérleti meghatározása:

Izolált reakciócentrum esetében, amennyiben gátlószer segítségével blokkoljuk a másodlagos kinon kötőhelyet, a reakciócentrum által kibocsátott késleltetett és prompt fluoreszcencia integrált intenzitás viszonyai alapján, meg tudjuk határozni a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti abszolút szabadenergia-különbséget. Felhasználva Arata és mtsai. által megadott összefüggést [15], valamint, ha az integrált intenzitásokat a késleltetett és prompt fluoreszcencia lecsengésének illesztése során kapott élettartam és amplitúdó értékek szorzatával közelítjük, akkor a következő kifejezést kapjuk:

$$\Delta G_{P^*A} = k_B T \cdot \ln\left(\frac{\phi_f}{k_f \cdot \phi_p} \cdot \frac{A_{kf} \cdot \tau_{kf}}{A_p \cdot \tau_p} \cdot t_{szűrő}\right), \quad (1)$$

ahol ΔG_{P^*A} a két állapot közötti szabadenergia-különbséget, k_B a Boltzmann-állandót, T a hőmérsékletet, ϕ_f a gerjesztett dimér prompt fluoreszcenciájának hatásfokát reakciócentrumban ($4,0 \pm 1,5 \cdot 10^{-4}$), k_f a bakterioklorofill sugárzási sebességi állandóját ($8 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, a Strickler-Berg összefüggés alapján), ϕ_p a töltésszétválasztás

kvantumhatásfokát ($0,98 \pm 0,04$), A az amplitúdót, τ az élettartamot, míg $t_{\text{szűrő}}$ a prompt mérés során alkalmazott üveg tárgylemezek és szürke-szűrő transzmisszióját jelöli.

A számítógép-szimulációk során alkalmazott módszerek és szoftverek:

A mutáns reakciócentrum-fehérje szerkezeteket az 1AIJ (krisztallográfiai adatok alapján megadott) struktúra, mint vadtípus felhasználásával, a PyMol szoftvercsomag [19] mutagenézis moduljának segítségével készítettem.

Az ubikinon-4 molekula parciális atomi töltéseit a Mopac93 programcsomagban [20] implementált Mulliken-féle populáció-analízis segítségével határoztam meg AM1 szemiempirikus kvantumkémiai szinten, kinon és egyszeres negatív töltéssel rendelkező szemikinin állapotokra.

Molekuladinamikai futtatásokat, valamint a szabadenergia perturbáció szimulációkat a Johan Åqvist és mtsai. által készített Q-package programcsomag [21] segítségével végeztem.

Az automatikus dokkolási szimulációkhoz az AutoDock 3.0.5 programcsomagot [22] alkalmaztam, a bemeneti fájlok elkészítését az AutoDockTools szoftverrel hajtottam végre.

4. Új tudományos eredmények

1. A bakterioklorofill dimér késleltetett és prompt fluoreszcencia intenzitásának összehasonlításával (az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon) meghatároztam az első stabil töltéspár ($P^+Q_A^-$) szabadenergia-szintjét a P^* szinthez képest *Rhodobacter sphaeroides* GA vadtípusú, és az elsődleges kinon akceptor közeli mutáns reakciócentrumoknál a fiziológias pH tartományban. A GA vadtípus esetében a két állapot közötti szabadenergia-különbségre -890 ± 5 meV-ot kaptam pH = 8,0-nál. (II)
2. Az M265IV apoláros mutánsnál a GA vadtípushoz hasonló késleltetett fluoreszcencia intenzitásokat mértem a fiziológias pH tartományban. A $P^+Q_A^-$ és P^* állapotok közötti szabadenergia-különbség (ΔG_{P^*A}) értéke pH = 8,0-nál -890 ± 10 meV, amely megegyezik a vadtípusú reakciócentrumnál kapott eredménnyel. Az M265IV mutánsra meghatározott ΔG_{P^*A} (ellentétben a vadtípussal) pH = 10-ig nem mutat pH-függést. Az eltérő pH-függés miatt pH = 10,5-nél a szabadenergia-különbségre (a GA vadtípushoz viszonyítva) már 20 meV-tal negatívabb értéket kaptam. (II)

3. Az M265 poláros mutánsainál (M265IS, M265IT) a GA vadtypushoz képest nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitásokat mértem az egész fiziológias pH tartományban. Ennek megfelelően ennél a két mutánsnál a P^* és a $P^+Q_A^-$ állapotok közötti szabadenergia-különbség lecsökken a vadtypushoz képest. A ΔG_{P^*A} értékére pH = 8,0-nál M265IS mutánsra -830 ± 10 meV-ot, míg M265IT mutánsra -775 ± 5 meV-ot kaptam. Összehasonlítva a GA vadtypusú reakciócentrumnál kapott értékkel ez azt jelenti, hogy az elsődleges kinon középponti redoxpotenciálja M265IS-nél -60 mV, míg M265IT-nél -115 mV értékkel eltolódik.

A rendelkezésre álló szerkezeti adatokból és a korábbi FTIR mérések eredményei alapján a megfigyelt jelenségre a következő magyarázatot adom: a poláros mutánsoknál változás következik be a kinon karbonil oxigénjei és a környező aminosavak közötti hidrogénhid távolságokban (lásd az ábrát). A szerin és a treonin hidroxil csoportja hidrogénhid kötést alakíthat ki a Thr^{M261} -es reziduum peptidvázát megfeszíti, és ezzel az M259-M262 reziduum csoport peptidvázát megfeszíti, és eltolja a kinon környezetéből. Eltávolodik az Ala^{M260} is, mely hidrogénhid távolságon belül helyezkedik el a natív ubikinon-10 $\text{C}_2=\text{O}$ karbonil csoportjához képest. A megváltozott környezet és a stabilizáló hidrogénhid kötések átrendeződése felelős az elsődleges kinon redox-tulajdonságainak megváltozásáért. (II)

4. Az M218MA és M218MG mutánsoknál a GA vadtypushoz képest szintén nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitásokat mértem az egész fiziológias pH tartományban. A ΔG_{P^*A} értékére pH = 8,0-nál M218MA mutánsra -835 ± 20 meV-ot, míg M218MG mutánsra -805 ± 10 meV-ot kaptam. Ezeket az értékeket összehasonlítva a GA vadtypusra kapott eredménnyel megállapítottam, hogy az elsődleges kinon középponti redoxpotenciálja az M218MA mutánsnál -55 mV, míg M218MG-nél -85 mV értékkel eltolódik. A ΔG_{P^*A} pH-függésének lefutása hasonló, a GA vadtypushoz és az M265-ös mutánsokhoz.

Az M218-as mutánsok esetében a $P^+Q_A^-$ állapotból történő töltésrekombináció ($k_P^A(\text{M218MA}) = 27 \text{ s}^{-1}$ és $k_P^A(\text{M218MG}) = 38 \text{ s}^{-1}$) szignifikánsan gyorsabb, mint a vadtypusú reakciócentrumnál ($k_P^A(\text{GA}) = 9.5 \text{ s}^{-1}$). Natív ubikinon-10-nél, és vadtypusú reakciócentrumnál a töltésrekombináció alagutazással történik a Q_A -ról a P^+ -ra [23]. Ha azonban a mutáció hatására a Q_A redoxpotenciálja alacsonyabbá (negatívabbá) válik, akkor a $P^+B_{\text{feo}}A^-$ -on keresztüli termikus aktivációs rekombinációs út is megnyílik. A $P^+Q_A^-$ állapotból történő töltésrekombináció sebességének felgyorsulása (k_P^A) egyértelmű

jele a termikus aktivációs út bekapcsolódásának.

Az atomi szerkezetet alapul véve a tapasztalt változásra az alábbi magyarázat adható (lásd az ábrát). A helyettesített alanin és glicin aminosavak sokkal kisebb térkitöltésűek, mint a vad típus metioninja, amely a B_{feo_A} és a Q_A között helyezkedik el, és az elektronok B_{feo} -ról Q_A -ra történő alagutazásában játszik kulcsszerepet. Az elektronoknak a metionon keresztüli út mellett a Trp^{M252} -on át vezető útvonal is rendelkezésre áll, és közelítőleg azonos valószínűséggel veszik igénybe a primér kinon redukálására. A Q_A helyen natív ubikinon-10-nek antrakinonnal való helyettesítésénél a töltésrekombinációkból meghatározott redoxpotenciál eltolódás kisebb mértékű volt az M218-as mutáns reakciócentrumnál, így a kisebb térkitöltésű aminosavak miatt több vízmolekula helyezkedik el az elsődleges kinon környezetében. Ezzel megváltozik annak szterikus és elektrosztatikus kölcsönhatása a környezetével. Az antrakinon, mivel jobban kitölti a rendelkezésre álló teret, kevesebb plusz vízmolekula bejutását engedi a megnövekedett térbe, így kisebb mértékű a közeponti redoxpotenciáljának az eltolódása. (II)

5. Megfigyelttem, hogy ha a detergenssel izolált reakciócentrumhoz kardiopint adtam, akkor a másodlagos kinonról történő töltésrekombináció ($P^+Q_B^- \rightarrow PQ_B$) nagymértékben lelassult. Az effektus a fél telítési állapotot 10-20 μM kardiopin hozzáadása esetén érte el. Mivel izolált reakciócentrum esetében a töltésrekombináció a másodlagos kinonról főként a $P^+Q_A^-$ -on keresztül indirekt módon történik [24, 25, 26], így emiatt a $Q_A^-Q_B \leftrightarrow Q_AQ_B^-$ elektronszfer egyensúlyi állandója megnövekszik. Ez a lassulás 100 μM kardiopin hozzáadása esetén $\text{pH} = 8,0$ -nál körülbelül háromszoros, ami a Q_A^- és Q_B szabadenergia-szintek közötti különbség 30 meV-os növekedésére utal. Ez a növekedés a két állapot közötti szabadenergia-különbségben az egész fiziológiai pH tartományban ($\text{pH} = 6$ -tól 10,5-ig) állandó marad. Kardiopin hozzáadása esetén a lassú fázis relatív amplitúdója 70%-ról 90%-ra emelkedik a töltésrekombináció kinetikájában, ami a Q_B hely betöltöttségének növekedését jelenti.

Egykinonos (terbutrinnal gátoltam a másodlagos kinon kötőhelyet) izolált GA vad típusú reakciócentrumnál a késleltetett fluoreszcencia intenzitása 5-7-szeresre emelkedett kardiopin jelenlétében. A ΔG_{P^*A} szabadenergia-különbség értéke 30 ± 10 meV-tal csökkent a kardiopin hozzáadását követően. A $P^+Q_A^-$ állapotból mérhető késleltetett fluoreszcencia intenzitásának növekedése, valamint a másodlagos kinonról történő töltésrekombináció lassulása arra utal, hogy a kardiopin bekötődése a reakciócentrumhoz 30 - 40 mV-tal negatív

irányban eltolja az elsődleges kinon középponti redoxpotenciálját. (II)

6. Megállapítottam, hogy megegyező reakciócentrum-koncentráció mellett két nagyságrenddel nagyobb a késleltetett fluoreszcencia intenzitása membránba ágyazott reakciócentrum (kromatofora) esetében, mint detergens oldatban. Ennek oka lehet, hogy a kromatofora membránjába ágyazott reakciócentrum egyrészt más környezetben van, másrészt más kölcsönhatásokban vesz részt, mint a detergenssel oldatba vitt (feloldott) reakciócentrum. Micelláris oldatban a fehérje a körülötte lazán és kevésbé struktúrált módon elhelyezkedő detergenssekkel többnyire csak gyenge kölcsönhatást alakít ki. Ezzel szemben a membránfrakciókban meghatározó jelentőségű lehet a membrán lipidjeivel való szorosabb és specifikus kölcsönhatás, amelynek eredményeképp jelentősen eltolódhat a primér kinon középponti redoxpotenciálja.
Az előző tézispontok alapján látható, hogy a Q_A körüli aminosavak mutációja jelentősen el tudja tolni a Q_A/Q_A^- redox pár középponti potenciálját, amely (amennyiben a negatívabb potenciálok irányában történik) a megfigyelt késleltetett fluoreszcencia nagymértékű (exponenciálisan emelkedő) változását váltja ki. Hasonló effektust figyeltünk meg a kardiolipin és a reakciócentrum kölcsönhatásában, amely a membránbeli természetes viszonyok nagyon közeli modelljének tekinthető. Több hasonló vizsgálat is alátámasztja azt az elképzelést, hogy természetes membránba ágyazva a Q_A/Q_A^- redox pár középponti potenciálja 100 mV értékkel is negatívabb lehet a detergens oldatbeli értékéhez képest. Ezekből azt a következtetést vonhatom le, hogy a késleltetett fluoreszcencia intenzitásában megfigyelt változás meghatározó effektusa a természetes membrán lipidjei és a reakciócentrum redox centrumai közötti energetikai csatolás.
7. Ikerionikus detergensnek (LDAO) kromatoforához való fokozatos adagolása során a késleltetett fluoreszcencia intenzitásának drasztikus (1-2 nagyságrendű) csökkenését, illetve a prompt fluoreszcencia mérsékelt (2-3-szoros) emelkedését figyeltem meg. A kromatoforát, szemben az izolált reakciócentrummal, nem csupán a reakciócentrum-membrán-lipid kölcsönhatás jellemzi, hanem a reakciócentrumnak az antenna-rendszerrel kialakítható szoros kapcsolata is. Míg izolált reakciócentrumban a késleltetett fluoreszcencia kizárólag a dimérből eredeztethető, addig kromatoforában fennáll annak a lehetősége is, hogy a visszreakcióval előállt P^* állapot nem dezaktiválódik késleltetett fluoreszcencia foton alakjában, hanem energia-(exciton)vándorlás révén az antenna-rendszerben delokalizálódik. A fotont valamelyik antenna pigment fogja emitálni, de ennek hatásfoka már nem szükségképp azonos a dimér fluoreszcencia

hatásfokával.

Az LDAO koncentrációjának növekedése a reakciócentrum és az antenna-rendszer közötti kapcsolat lazulását, illetve teljes felszakadását eredményezi. A mérési eredmények arra engednek következtetni, hogy a fluoreszcencia hatásfoka attól függően különbözik, hogy az elektron gerjesztett állapot (exciton) a reakciócentrum dimérében, vagy az antenna egyik bakterioklorofiljában dez-aktiválódik. Az LDAO titráláson alapuló méréseim inkább azt valószínűsítik, hogy az antennában kisebb hatásfokú a fluoreszcencia emissziója, mint a reakciócentrum dimérében.

8. Q_A és Q_B között gátolva az elektronátadást a kromatofora késleltetett fluoreszcencia kinetikájának milliszekundumos időtartományában a $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ visszareakciót tükröző lassú lecsengés (≈ 100 ms élettartam) mellett egy gyors (10 ms körüli élettartamú) komponens megjelenését figyeltem meg, amelynek nincs megfelelője sem a detergenssel feloldott (izolált) reakciócentrum késleltetett fluoreszcenciájában, sem a hasonló körülmények között felvett és az oxidált dimérre jellemző abszorpcióváltozásában. Ez legegyszerűbben úgy értelmezhető, hogy a gyors komponenssel jellemezhető átmeneti állapot a $P^+Q_A^-$ töltésszeparált állapot és fehérjekörnyezetének még nem relaxált formája, amelynek meglehetősen hosszú időre van szüksége az egyensúly visszanyerésére. Mivel mind a relaxálatlan, mind a relaxált állapot ugyanahhoz a redox állapothoz tartozik, ezért közöttük abszorpcióban nem tudunk különbséget tenni, azaz a relaxálatlan állapot "csendes". A késleltetett fluoreszcenciája alapján azonban megkülönböztethető a két állapot.

A kromatoforában megfigyelt késleltetett fluoreszcencia gyors és lassú komponensei számos kezelés hatására hasonlóan viselkednek. A komponensek kialakulásáért felelős állapotok szabadenergiáinak pH-függése nagy hasonlóságot mutat, akár csak az LDAO detergenssel való kölcsönhatásuk, az aktuális redoxpotenciáltól való függésük, vagy a külső elektron donorokkal (ferrocen, TMPD) szembeni viselkedésük. Mindezek a hasonlóságok azt jelzik, hogy közeli és megegyező alaptulajdonságú állapotokhoz köthető a két komponens. Jelentősebb eltérést a hőmérséklet változtatásával szembeni viselkedés mutatott. A van't Hoff ábrázolások egyértelműen jelezték, hogy két teljesen eltérő entalpia- és entrópia-változás jellemzi a $P^+Q_A^- \rightarrow P^*$ folyamatot a gyors és a lassú komponensek esetében. A nem relaxált $P^+Q_A^-$ állapotból nagyon kicsiny entalpia-változás ($\Delta H \approx 45$ meV) vezet a P^* elektron gerjesztett állapot (vissza-, illetve be-)népesítéséhez, míg ugyanez a folyamat a relaxált $P^+Q_A^-$ állapotból $\Delta H \approx 620$ meV entalpia-változást igényel. Mivel mindkét szint

gyakorlatilag ugyanabban a mélységben van, azaz körülbelül ugyanakkora a szabadenergia-változás, ezért az entalpia-változásban megmutatkozó különbséget az entrópia-változás kompenzálja.

9. Inhibitorral gátolva a $Q_A^-Q_B$ és a $Q_AQ_B^-$ állapotok közötti elektrontranszfert a P^* állapothoz képest kisebb csapdamélységgel (és ezért nagyobb késleltetett fluoreszcencia intenzitással) rendelkező $P^+Q_A^-$ állapot populációjának növekedését érjük el. Kromatofora esetében semleges pH-nál ($pH = 7,0$) a stigmatellin és a terbutrin inhibitorok hasonló viselkedését figyeltem meg, azaz mindkét gátlószer hatása telítésbe vihető megfelelően magas koncentráció alkalmazása esetén.

Alkalikus pH értékeknél ($pH = 10,0$) ezzel szemben a két inhibitor eltérő viselkedést mutatott: míg a terbutrin hatását telítésbe tudtam vinni, addig a stigmatellinnél ez nem volt elérhető még $50 \mu M$ inhibitor koncentrációnál sem. Detergensbe ágyazott reakciócentrumnál nem tapasztaltam ekkora mértékű eltérést a stigmatellin hatásában, különböző pH értékeknél.

A jelenség hátterében a reakciócentrumnak a membrán-környezettel kialakított speciális kölcsönhatása állhat. Magas pH-n ez a kölcsönhatás deformálhatja a másodlagos kinon kötőhely geometriáját, amely egyes inhibitoroknál (jelen esetben a stigmatellinnél) a stabilizációt szolgáló hidrogénhid kötések felszakadását eredményezheti. Ez a kötési affinitás oly mértékű csökkenéséhez vezethet, amely az inhibitorral való telíthetőség megfigyelt elmaradását eredményezi. (III)

10. Meghatároztam az ubikinon-4 molekula parciális atomi töltéseit kinon és egy-szeres negatív töltéssel rendelkező szemikinin állapotokra Mulliken-féle populáció-analízis segítségével gázfázisban (Mopac93 programcsomag felhasználásával [20]), AM1 szemiempirikus kvantumkémiai szinten. A későbbi szimulációk során a meghatározott töltésértékeket használtam fel. A kiszámolt töltések az 1AIJ struktúrában [16] felvett geometriára vonatkoznak. (I)

11. Dokkolási szimuláció segítségével meghatároztam az ubikinon-4 molekula kötési szabadenergiáját az elsődleges kinon kötőhelyre vad típusú és mutáns reakciócentrumoknál, kinon és szemikinin redox állapotokra. A vad típus reakciócentrum-fehérjének a röntgenkristallográfiai adatok alapján készített 1AIJ jelű struktúrát [16] használtam fel, és a mutáns reakciócentrumokat is ebből a szerkezetből kiindulva készítettem.

$\Delta G_{\text{kötési}}$ értékére vad típus és kinon redox állapotokra $-13,11 \text{ kcal/mol}$ -t kaptam, mely érték megegyezik a kísérleti adatokkal [27]. M265IS, M265IV és

M218MG mutánsoknál ennél negatívabb, míg M218MA és M265IT esetében ennél pozitívabb kötési szabadenergiát kaptam kinon állapotra. A kísérleti adatok alapján a pozitívabb kötési szabadenergiák voltak a várhatóak. Szemikinin állapotban és szimmetrikus töltéseloszlásnál az M265IS mutáns kivételével minden mutánsra negatívabb kötési szabadenergiát kaptam, mint a vad típusú reakciócentrum esetében ($\Delta G_{\text{kötési}} = -15,29 \text{ kcal/mol}$).

A dokkolási szimulációval kapott kötési szabadenergiák (kinon/szemikinin állapotra) felhasználásával meghatároztam az ubikinon-4 középponti redoxpotenciál-eltolódását a vad típusúhoz képest a Q_A kötőhelyen (felhasználva, hogy az ubikinon molekula középponti redoxpotenciálja víz oldószerben -145 mV [28]). Az eltolódások értékei csak részben mutattak egyezést a kísérleti eredményekkel. Az M218MA és M265IT mutánsok pozitív eltolódást, míg az M265IS mutáns negatív eltolódást mutatott mindegyik töltéseloszlásnál. (IV)

12. Szabadenergia perturbáció módszer segítségével modelleztem a kinon redukciójának folyamatát a fotoszintetikus reakciócentrumban. A perturbáció során a kinon atomi parciális töltéseit változtattam meg, hogy azok megfeleljenek a kinon, illetve az egyszeres negatív töltéssel rendelkező szemikinin állapotoknak. A perturbáció során a két állapot közötti szabadenergia-különbség értéket követtem nyomon. A szimulációt különböző töltéseloszlásoknál, valamint megelőző molekuladinamikai futtatást követően is elvégeztem. Tekintve a kiindulási (kinon) és végállapot (szemikinin) közötti szabadenergia-különbséget, és annak eltolódási irányát a vad típusnál kapott értékhez képest, a legjobb közelítésnek a szimmetrikus töltéseloszlás, és a megelőző molekuladinamikai szimuláció együttes használata mutatkozott. Ebben az esetben az eltolódási sor a vad típusúhoz képest a következő volt: pozitív irány: M265IS, negatív irány: M265IV, M218MA és M265IT. Megvizsgálva a kinonmolekula metoxi-csoportjainak nyílásszög-változását a redukció során, szembetűnő eltérést csak az M265IS és M218MA mutánsok esetében kaptam, mindkét esetben a C3-O3-C3H₃ metoxi-csoport nyílásszöge nőtt meg a szemikinin állapotban (13-15 °-os változás). A kinon és környezete közötti hidrogénhid kötések is megváltoznak a redox folyamat során. Minden esetben vagy a hidrogénhid kötések számának növekedését, vagy a meglévő kötések kötéstávolságának csökkenését figyeltem meg. Ez egybevág a korábbi tapasztalattal, mely szerint az elsődleges kinon állapotát stabilizálja az elektron felvétele. (IV)

RC típus	Donor atom neve		Távolság [Å]	
	kinon	környezet	kinon áll.	szemikinin áll.
Vadtípus	UQA:O2	Thr ^{M222} :HG1	3,31	1,48
	UQA:O2	Trp ^{M252} :HE1	3,33	2,12
	UQA:O5	Ala ^{M260} :H	3,09	1,65
M265IV	UQA:O2	Thr ^{M222} :HG1	3,38	1,77
	UQA:O2	HOH ¹²⁸² :H2	5,48	1,79
	UQA:O5	HOH ¹¹³⁰ :H2	3,38	1,65
M265IS	UQA:O2	His ^{M219} :HD1	3,17	1,77
	UQA:O2	Thr ^{M222} :HG1	2,48	2,16
	UQA:O2	Trp ^{M252} :HE1	3,40	2,88
	UQA:O5	Ala ^{M260} :H	2,51	1,69
M265IT	UQA:O2	Thr ^{M222} :HG1	1,82	1,50
	UQA:O2	Trp ^{M252} :HE1	2,68	3,40
	UQA:O5	Thr ^{M265} :HG1	5,42	1,99
	UQA:O5	HOH ¹¹⁶³ :H2	1,71	1,55
M218MA	UQA:O2	His ^{M219} :HD1	4,55	2,60
	UQA:O2	Thr ^{M222} :HG1	3,31	1,56
	UQA:O5	Ala ^{M260} :H	2,65	2,50

A hidrogénhíd kötések számának és kötéstávolságának változása a FEP szimuláció során, vad típusú és mutáns RC-oknál. A struktúrákon előzetes MD szimulációt hajtottunk végre, és a szemikininon minden esetben szimmetrikus a töltéeloszlás. A lehetséges hidrogénhíd távolságokat (< 3,0 Å) megvastagítással jelöltem.

Hivatkozások

- [1] S.C. Straley, W.W. Parson, D.C. Mauzerall, és R.K. Clayton. Pigment content and molar extinction coefficients of photochemical reaction centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 305(3):597–609, 1973.
- [2] T. Kawatsu, T. Kakitani, és T. Yamato. Destructive interference in the electron tunneling through protein media. *J. Phys. Chem. B*, 106(43):11356–11366, 2002.
- [3] H. Nishioka, A. Kimura, T. Yamato, T. Kawatsu, és T. Kakitani. Interference, fluctuation, and alternation of electron tunneling in protein media. 1. two tunneling routes in photosynthetic reaction center alternate due to thermal fluctuation of protein conformation. *J. Phys. Chem. B*, 109(5):1978–1987, 2005.
- [4] R.C. Prince, P.L. Dutton, és J.M. Bruce. Electrochemistry of ubiquinones: Menaquinones and plastoquinones in aprotic solvents. *FEBS Letters*, 160(1,2):273–276, 1983.
- [5] J.P. Allen, G. Fehér, T.O. Yeates, H. Komiya, és D.C. Rees. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: Protein-cofactor (quinones and Fe^{2+}) interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8487–8491, 1988.
- [6] M.Y. Okamura, R.A. Isaacson, és G. Fehér. Spectroscopic and kinetic properties of the transient intermediate acceptor in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 546:394–417, 1979.
- [7] M.Y. Okamura, R.A. Isaacson, és G. Fehér. Primary acceptor in bacterial photosynthesis: Obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3491–3495, 1975.
- [8] A.R. Crofts és C.A. Wraight. The electrochemical domain of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 726:149–185, 1983.
- [9] N.W. Woodbury, W.W. Parson, M.R. Gunner, R.C. Prince, és P.L. Dutton. Radical-pair energetics and decay mechanisms in reaction centers containing anthraquinones, naphthoquinones or benzoquinones in place of ubiquinone. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 851:6–22, 1986.

- [10] I. Sinning. Herbicide binding in the bacterial photosynthetic reaction center. *Trends in Biol. Sci.*, 17:150–154, 1992.
- [11] A.W. Rutherford és M.C.W. Evans. Direct measurement of the redox potential of the primary and secondary quinone electron acceptors in *Rhodopseudomonas sphaeroides* (wild-type) by EPR spectrometry. *FEBS Letters*, 110(2):257–261, 1980.
- [12] P.H. McPherson, M.Y. Okamura, és G. Feher. Electron transfer from the reaction center of *Rb. sphaeroides* to the quinone pool: doubly reduced Q_b leaves the reaction center. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1016:289–292, 1990.
- [13] R.K. Clayton. *Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns*. Cambridge University Press, Cambridge, 1980.
- [14] S. Malkin. Delayed luminescence. In J. Barber (szerk.): *Primary Processes of Photosynthesis* (konferenciaanyag), 349-431 old. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1977.
- [15] H. Arata és W.W. Parson. Delayed fluorescence from *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers enthalpy and free energy changes accompanying electron transfer from P-870 to quinones. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 638:201–209, 1981.
- [16] M.H. Stowell, T.M. McPhillips, D.C. Rees, S.M. Soltis, E. Abresch, és G. Fehér. Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: Implications for mechanism of electron-proton transfer. *Sciences*, 276(5313):812–816, 1997.
- [17] P. Maróti és C.A. Wraight. Flash-induced H^+ binding by bacterial photosynthetic reaction centers: comparison of spectrophotometric and conductometric methods. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 934(3):314–328, 1988.
- [18] K. Turzó, G. Laczkó, és P. Maróti. Delayed fluoreszcence study on $P^*Q_A \rightarrow P^+Q_A^-$ charge separation energetics linked to protons and salt in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis Research*, 55:235–240, 1998.
- [19] W.L. DeLano. *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002.

- [20] J.P.P. Stewart. *MOPAC 93.00 Manual (Rev. 2)*. Fujitsu Limited, Tokyo Japan, 1993.
- [21] J. Marelus, K. Kolmodin, I. Feierberg, és J. Åqvist. Q: A molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 16:213–225, 1998.
- [22] G.M. Moris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, és A.J. Olson. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19:1639–1662, 1998.
- [23] M.R. Gunner, D.E. Robertson, és P.L. Dutton. Kinetic studies on the reaction centers protein from *Rhodospseudomonas sphaeroides*: the temperature and free energy dependence of electron transfer between various quinones in the Q_A site and the oxidized bacteriochlorophyll dimer. *J. Phys. Chem. B*, 90:3783–3795, 1986.
- [24] D. Kleinfeld, M.Y. Okamura, és G. Fehér. Electron transfer in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Determination of the charge recombination pathway of $D^+Q_aQ_b^-$ and free energy and kinetic relations between $Q_a^-Q_b$ and $Q_aQ_b^-$. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 766:126–140, 1984.
- [25] C.A. Wraight és R.R. Stein. Bacterial reaction centers as a model for photosystem ii. Turnover of the secondary acceptor quinone. In Y. Inoue, A.R. Crofts, N.M. Govindjee, G. Renger, és K. Satoh (szerk.): *The Oxygen Evolving System of Photosynthesis* (konferenciaanyag), 383-392 old. Academic Press, Tokyo, 1983.
- [26] C.A. Wraight. Electron acceptors of bacterial photosynthetic reaction centers: II. H^+ binding coupled to secondary electron transfer in the quinone acceptor complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 548:309–327, 1979.
- [27] K. Warncke, M.R. Gunner, B.S. Braun, L. Gu, C.A. Yu, J.M. Bruce, és P.L. Dutton. Influence of hydrocarbon tail structure on quinone binding and electron-transfer performance at the Q_A and Q_B sites of the photosynthetic reaction center protein. *Biochemistry*, 33:7830–7841, 1994.
- [28] Z. Zhu és M.R. Gunner. Energetics of quinone-dependent electron and proton transfer in *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, 44:82–96, 2005.

5. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- I. **Rinyu L.**, Nagy L. and Körtvélyesi T.: The role of the electronic structure of quinones in the charge stabilization in photosynthetic reaction centers. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 571: 163-170, (2001).
- II. **Rinyu L.**, Martin E.W., Takahashi E., Maróti P. and Wraight C.A.: Modulation of the free energy of the primary quinone acceptor (Q_A) in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: contributions from the protein and protein-lipid(cardiolipin) interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1655: 93-101, (2004).
- III. Gerencsér L., **Rinyu L.**, Kálmán L., Takahashi E., Wraight C.A. and Maróti P.: Competitive binding of quinone and antibiotic stigmatellin to reaction centers of photosynthetic bacteria. *Acta Biologica Szegediensis*, 48(1-4): 25-33, (2004).
- IV. **Rinyu L.**, Körtvélyesi T. and Maróti P.: Molecular dynamics approach to energetics of primary quinone in bacterial reaction centers. Kézirat (beküldésre előkészítve).

6. Egyéb publikációk

1. **Rinyu L.**, Méray N., Tandori J., Pfeiffer I., Maróti P., Nagy L.: Steric and electrostatic effects on the stabilization of the secondary quinone in reaction centers. *Photosynthesis: Mechanism and effects. Proceedings of 11th International Congress on Photosynthesis. Budapest, Hungary, 17-22 Aug., 1998.* Szerk.: G. Garab. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 833-, (1998).
2. Nagy L., Fodor E., Tandori J., **Rinyu L.**, Farkas T.: Lipids affect the charge stabilization in wild-type and mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 465- , (1999).
3. Halmschlager A., Tandori J., Trotta M., **Rinyu L.**, Pfeiffer I., Nagy L.: A mathematical model for quinone-herbicide competition in the reaction centres of *Rhodobacter sphaeroides*. *Functional Plant Biology* 29: 433-, (2002).

4. Molnár M., Joó K., Barczy A., Szántó Zs., Futó I., Palcsu L., **Rinyu L.**: Dating of total soil organic matter used in kurgan studies. *Radiocarbon* 46: 413-, (2004).
5. Molnár M., Szántó Zs., Svingor É., Palcsu L., Futó I., **Rinyu L.**: Gas generation measurements in drums containing LL/ILW. Waste Management, Energy Security and a Clean Environment. WM 04 Conference. Tucson, Arizona, Feb. 29 - March 4, 2004. Proceedings. Tucson, WM Symphosia Inc. 0: 204-, (2004).
6. Palcsu L., Svingor É., Szántó Zs., Molnár M., Futó I., Major Z., **Rinyu L.**: Isotopic composition of precipitation in Hungary in 2001 and 2002. International Symposium on Isotope Hydrology and Integrated Water Resources Management. Vienna, Austria, 19-23 May, 2004. Proceedings. Vienna, IAEA 0: 306-, (2004).
7. Molnár M., Palcsu L., Svingor É., Futó I., Major Z., **Rinyu L.**, Veres M.: Isotope-analytical results of a study of gas generation in L/ILW. *Czechoslovak Journal of Physics* 56: 637-, (2006).
8. Szántó Zs., Svingor É., Futó I., Palcsu L., Molnár M., **Rinyu L.**: A hydrochemical and isotopic case study around a near surface radioactive waste disposal. *Radiochimica Acta* 95: 55-, (2007).
9. **Rinyu L.**, Futó I., Kiss Á.Z., Molnár M., Svingor É., Quarta G., Calcagnile L.: Performance test of a new graphite target production facility in ATOMKI. *Radiocarbon*, kézirat elfogadva. (2007).

Könyvfejezet

Svingor É., Molnár M., Palcsu L., Futó I., Major Z., **Rinyu L.**, Szántó Zs., Barnabás I.: Monitoring vizsgálatok a Püspökszilágyi radioaktív hulladék kezelő és tároló környezetében. (in Hung.) Magyarország környezetkéimiai állapota. Szerk.: Szendrei G. Bp., Innova Print Kft 161-, (2006).